# การจำแนกชนิดของราบำบัดสีด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์

# Identification of Decorlorization Fungi Using ITS-PCR

**ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง, ธีระชัย ธนานันต์ และ นิรมล ศากยวงศ์***

Piyawan Klomklieng, Theerachai Thanananta and Niramol Sakkayawong*

*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120*

*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Pathum Thani, 12120*

**Corresponding author: bunyason@hotmail.com*

## บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมฟอกย้อมสิ่งทอมีการใช้สีย้อมในกระบวนการผลิต โดยส่วนใหญ่นิยมใช้สีย้อมที่อยู่ในกลุ่มรีแอคทีฟ ซึ่งทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ ทำให้ตกค้างในสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศ จึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีบำบัดที่เหมาะสม จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า ราคือหนึ่งในกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ รวมทั้งสีย้อมได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงคัดเลือกราจากดินบริเวณโรงงานฟอกย้อมที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อมรีแอคทีฟ เมื่อคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง พบราจำนวน 7 ไอโซเลต ที่สามารถบำบัดสีย้อม reactive red 141 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงศึกษาสัณฐานวิทยาโดยเลี้ยงบนอาหาร Czapek's agar (CZA) ตามวิธีของ Raper and Funnell (1965) และได้ระบุชนิดด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์

## ABSTRACT

The textile industries use dyes in the production process. Reactive dyes are widely used in the textile industries but are resistant to biodegradation, and persist in the environment. The contamination of reactive dyes in the environment causes adverse effects on the ecosystem. Fungi are one of the microbial groups that have been reported to degrade various complex compounds, including synthetic reactive dyes. This study focused on screening and identified a potent fungus that is able to decolorize reactive dyes from soil. The primary screening in agar plate results showed that 7 isolate of fungi were able to decolorize both reactive red 141 at a concentration of 50 mg/L. Among 7 isolate were screened and identified using for investigating fungal morphology by fungal growth comparatively on Czapek's Agar (CZA) as selective media. The obtained fungi were screened and identified using fungal growth comparatively on Czapek's Agar (CZA) as selective media for investigating fungal morphology and using ITS-PCR method.

**คำสำคัญ**: ราบำบัดสี, สีรีแอคทีฟ, อุตสาหกรรมสิ่งทอ, ไอทีเอสพีซีอาร์

**Keywords:** decolorization fungi, reactive dye, textile industry, ITS-PCR

## บทนำ

ราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในฐานะผู้ย่อยสลายของระบบนิเวศ ดำรงชีวิตได้หลายแบบ รวมทั้งอยู่เป็นอิสระ ราส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบการย่อยสลายและดูดซึมสารอาหารจากซากของสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว จากการดำรงชีวิตที่หลากหลายนี้ทำให้สามารถนำราไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย ทั้งด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การแพทย์ และสิ่งแวดล้อม สำหรับการฟื้นฟูสิ่งแวดล้อมทางชีวภาพนั้นพบว่าราสามารถกำจัดสารพิษออกจากสิ่งแวดล้อมได้หลายชนิด ทั้งสารประกอบพอลิไซคลิก อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน สีย้อม และโลหะหนัก กลไกที่ราใช้ในการบำบัดมีทั้งการดูดซับไว้กับโครงสร้างของผนังเซลล์และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่หลั่งออกมานอกเซลล์

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การคัดแยกราที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายสี**

แยกราจากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อม จ.สมุทรปราการ ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 10 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร เขย่า (shaker) ที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนดินขนาดใหญ่ตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายดินด้วยวิธี dilution method แล้ว spread plate บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมสีย้อมสีแดง Reactive red 141 (RR 141) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อราเจริญบนจานอาหารจึงแยกโคโลนีของราที่ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีแดงจางลงมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

2. **การจำแนกและระบุชนิดของราทางสัณฐานวิทยา**

ระบุชนิดของราด้วยสัณฐานวิทยา (morphology) โดยเพาะเลี้ยงราด้วยเทคนิค slide culture ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงราบนอาหารแข็งชนิด Czapek dox agar ในจานเพาะเชื้อ วัดส่วนประกอบของโครงสร้างราด้วยไมโครมิเตอร์ และจำแนกชนิดด้วยการเปรียบเทียบกับรามาตรฐานและคู่มือการจำแนกชนิดของรา (Gilman, 1957; Hawksworth *et al*., 1995; Raper, 1965)

3. **การสกัดดีเอ็นเอจากรา**

เลี้ยงราบนอาหาร PDA เมื่อราเจริญเต็มที่จึงเขี่ยเอาเส้นใยหรือสปอร์มาสกัดแยกดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method (ดัดแปลงจาก Donnell *et al*., 1997) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

4. **การเพิ่มชิ้นส่วนไอทีเอสด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส**

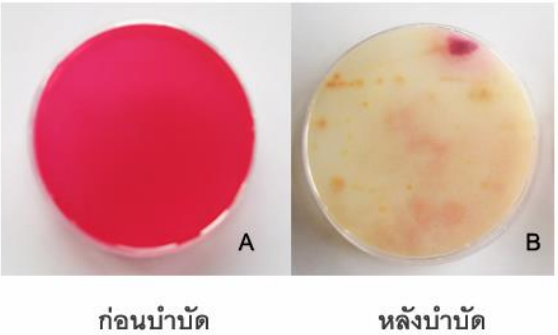
ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนไอทีเอส (ITS, internal transcribed spacers) บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของยีน *rDNA* ในราที่แยกได้ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5′-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3′) และ ITS4 (5′-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3′) (White *et al*.,1990)

5. **การวิเคราะห์ผลด้านโมเลกุล**

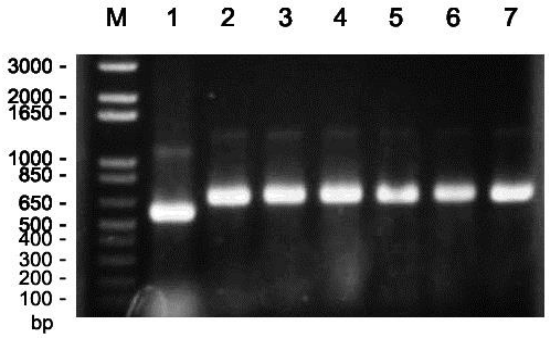
ส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับเบสที่ บริษัท SolGent Co., Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ และบริษัทจะส่งลำดับเบสกลับมาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ใส่โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิดของรา

## ผลการทดลองและวิจารณ์

ราที่สามารถบำบัดสีย้อมทั้ง 7 ไอโซเลต คือ AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6 และ BP1 เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาและวิธีไอทีเอสพีซีอาร์พบว่า ผลการระบุชนิดทางสัณฐานวิทยามีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ เมื่อเปรียบเทียบความละเอียดในการระบุชนิดของราจากทั้ง 2 วิธี จะเห็นได้ว่าวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ซึ่งใช้ลำดับเบสของไอทีเอสของยีน *rDNA* สามารถจำแนกชนิดของราในระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูงกว่าบริเวณอื่นและเป็นลำดับเบสอนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงสามารถใช้จำแนกและแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันของราได้




**รูปที่** 1 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสีย้อม RR 141 ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร(A) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการบำบัดสีด้วยรา(B)




**รูปที่** 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีไอทีเอสพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-7 คือ รา ไอโซเลตBA1, AP1, AP2, AP3, AP4, AP5 และ AP6 ตามลำดับ]

**ตารางที่** 1 ชนิดของราที่จำแนกด้วยสัณฐานวิทยาและวิธีไอทีเอสพีซีอาร์

| รหัสเชื้อ | การจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา | การจำแนกด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์ |
|---|---|---|
| AP1 | *Aspergillus terreus* | *Aspergillus terreus* isolate SUMS0191 |
| AP2 | *Aspergillus ustus* | *Aspergillus ustus* isolate wb151 |
| AP3 | *Aspergillus ustus* | *Aspergillus ustus* strain UWFP 1132 |
| AP4 | *Aspergillus terreus* | *Aspergillus terreus* isolate SUMS0191 |
| AP5 | *Aspergillus* sp. | *Aspergillus pseudodeflectus* strain AS3.15310 |
| AP6 | *Aspergillus Niger* | *Aspergillus niger* strain CICC 2041 |
| BP1 | *Gongronella* sp. | *Gongronella butleri* strain CBS 102.44 |

## สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาลักษณะและการเจริญของโคโลนีของราบำบัดสี 7 ไอโซเลต พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงราในสภาวะอุณหภูมิและบนอาหารชนิดเดียวกัน ลักษณะโคโลนีของราและสีอาหารของแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน โดยสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของราที่แยกได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม จึงระบุชนิดของราได้ยาก แต่จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของราบำบัดสี 7 ไอโซเลต โดยอาศัยความหลากหลายบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของยีน *rDNA* พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ภายใต้สภาวะเดียวกัน สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันของราได้

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 (เลขที่สัญญา 009/2556) และขอขอบคุณ ดร.สายัณห์ สมฤทธิ์ผล ห้องปฏิบัติการราวิทยา ศูนย์พันธุ-วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม. ตำราระบบบำบัดมลพิษน้ำ. กรุงเทพ:สำนักพิมพ์เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2548.

Anastasi, A., Prigione, V., Casieri, L., and Varese, G.C. Decolourization of model and industrial dyes by mitosporic fungi in different culture condition. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009; 25:1363-1374.

Chandra, M., Viswanath, B., and Reddy, B. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. Indian Journal of Microbiology. 2007;47(4):323-328.

Gilman J.C. Manual of soil fungi. The Iowa State University Press. Iowa USA. 1957:450

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. Dictionary of the fungi. CAB international, New York, USA.1995.

O'Donnell, P., Lavin, A., Enquist, L.W., Grace, A.A. and Card, J.P. Interconnected parallel circuits between rat nucleus accumbens and thalamus revealed by retrograde transynaptic transport of pseudorabies virus. The Journal of Neuroscience.1997; 17:2143–2167.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.

Raper K.B. and Fennell D.I. The genus Aspergillus. Williams&Wilkins Baltimore USA. 1965:686

White T.J., Bruns T.D., Lee S. and Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.1990.315-322.